

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

GYÓGYNÖVÉNYEK ÉS NÖVÉNYI HATÓANYAGOK  
BIZTONSÁGOSSÁGA ÉS HATÁSOSSÁGA  
FITOKÉMLAI ÉS FARMAKOLÓGIAI  
VIZSGÁLATOK TÜKRÉBEN

**Csupor Dezső**

Készült a Szegedi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Karának  
Farmakognóziai Intézetében

Szeged

2020

dc\_1800\_20

## 1. Bevezetés

A természetes anyagok, köztük a növényi drogok, kivonatok és hatóanyagok a történelem kezdete óta részei a gyógyászatnak. A gyógynövényhasználat módja lényegileg évszázadokon át változatlan volt, az első jelentős változást a szerves kémia elméleti hátterének és módszereinek kialakulása hozta a 18–19. században. A 20. század a szintetikus gyógyszergyártás módszereinek és ipari feltételeinek kialakulása révén gyökeres változást hozott a gyógynövények alkalmazásában. A korábban hagyományos drog- és gyógynövénykivonat alapú termékek jelentősége visszaszorult, a gyógyszerkincsben egyre nagyobb arányban jelentek meg a szintetikus vegyületek. Bár a genuin növényi hatóanyagok jelentősége is csökkent, helyesebb inkább hangsúlyváltásról beszélni: az új gyógyszervegyületek között a növényi szekunder metabolitok aránya kicsi, jelentős részt tesznek ki viszont azok a farmakonok, amelyek valamilyen módon összefüggésbe hozhatóak ilyen anyagokkal. A természetes anyagok gyógyszerkutatásban máig tartó jelentősége azzal magyarázható, hogy ezen vegyületek között nagyon magas a bioaktív anyagok aránya. A klasszikus, természetes eredetű farmakoforon alapuló (fél)szintetikus vegyületekre fókuszáló gyógyszerfejlesztés és a növényekben kis koncentrációban megtalálható hatóanyagok ipari hasznosítása is új lehetőséget kapott azáltal, hogy biotechnológiai módszerekkel számos vegyület gazdaságosabb előállítására nyílik mód. Mindezek mellett a gyógynövények kivonatként való alkalmazása is a farmakoterápia része.

A gyógynövények vizsgálata több szempontból is perspektivikus. A gyógynövények közül csak nagyon keveset térképeztek fel kémiai alapon. A növények zöménél a hatóanyagok sem ismertek teljes körben, nem is beszélve a nemkívánatos hatásokért felelős, vagy az olyan, biológiailag jelentős aktivitással nem rendelkező anyagokról, amelyek valamelyest a kívánatos és nemkívánatos hatásokat is befolyásolhatják. Alapvető fontosságú olyan új vegyületek kinyerése és szerkezetazonosítása, amelyek a terápiás alkalmazhatóság vagy biztonság szempontjából jelentősek. A kvalitatív azonosításon túlmutató, kvantitatív adatokat szolgáltató eredmények is hiányosak, jól lehet a növényi kivonatok hatásosságát és mellékhatásprofilját ezek is befolyásolják. A kémiai vizsgálatokat kiegészítő farmakológiai kutatások új hatások, hatóanyagok, nemkívánatos hatásokért felelős vegyületek azonosításához vezethetnek. A növényi kivonatok, vegyületek toxikológiai elemzése szintén fontos feladat, mivel a legelterjedtebben alkalmazott növények zömének sem teljesen feltárt a toxikológiai profilja.

## 2. Kutatási célok

A bevezetőben foglaltakat figyelembe véve az itt bemutatott munka fókuszában olyan fitokémiai, -farmakológiai és a hatásosság, biztonságosság értékelését célzó vizsgálatok voltak, amelyek

- preparatív kémiai kutatások eredményeként új szekunder metabolitok, közöttük új potenciális hatóanyagok azonosítása céljából,
- új bioaktivitások felderítését célozták,
- ismert vegyületek, köztük ható- és nemkívánatos hatásokért felelős anyagok kimutatására, mérésére, minőségvizsgálatra alkalmas módszerek kidolgozására irányultak, valamint
- gyógynövénykivonatok hatásosságának felmérésére és biztonságossági profiljuk kiegészítésére irányultak.

A **preparatív növénykémiai vizsgálatok** kiindulási alapja és célja eltérő volt az egyes növények esetén. Az *Aconitum* fajoknál a cél a nemzetségre jellemző diterpén-alkaloidok kinyerése volt a kémiai tér bővítése és **új, bioaktív vegyületek és aktivitások** megismerése érdekében. Hasonló motiváció indokolta a lipoalkaloidok félszintézisét, valamint a *Heliopsis helianthoides* és a *Lepidium meyenii* vizsgálatát. A *Paraleucobryum longifolium* tanulmányozásának kettős célja volt: szerettünk volna kémiai adatokat gyűjteni erről a korábban szinte egyáltalán nem tanulmányozott fajról, valamint megismerni az antiproliferatív és antibakteriális hatásért felelőssé tehető tartalomanyagokat. A *Cyclopia genistoides* vizsgálatánál a cél a fitoösztrogén hatású vegyületek azonosítása volt, vegyülettípustól függetlenül. A *Ducrosia anethifolia* vizsgálatának motivációja a növény kémiai feltérképezése volt, különös tekintettel a furokumarinokra, mivel erről a gyógyászatban és táplálkozásban is használt fajról ilyen tekintetben nem állnak rendelkezésre átfogó információk.

A **nemkívánatos hatású és hatóanyagok mérésének** első lépése a mérési módszer kidolgozása. A kvalitatív és kvantitatív analízis célja lehet élelmisznövényként is használt gyógynövények (pl. *Camellia sinensis*, *Foeniculum vulgare*) összetételének pontosabb megismerése az élelmiszerbiztonság fokozásának céljából, vagy gyógyászati céllal alkalmazott kivonatok elemzése a biztonságosság és hatásosság jobb megismerése érdekében (*Rhodiola rosea*, *Vitex agnus-castus*, *Silybum marianum*).

A **hatásossági és biztonságossági vizsgálatok** a népi gyógyászatban alkalmazott fajok, a *Centaurea sadleriana* sebgyógyító és az *Anthemis nobilis* görcsoldó hatásának tanulmányozásától a *Symphytum officinale* toxikus alkaloidjainak bőrről való felszívódásának tanulmányozásán át az *Ambrosia artemisiifolia* szubakut toxicitásának elemzéséig terjedtek. *In vitro* módszerek segítségével elemeztük alkaloidok specifikus és nem-specifikus toxicitását. Elsőként végeztünk Magyarországon olyan kutatást, amely részeként klinikailag vizsgált növények (*Vitex agnus-castus*, *Crataegus* sp., *Crocus sativus*) hatásosságát elemeztük metaanalízisek segítségével.

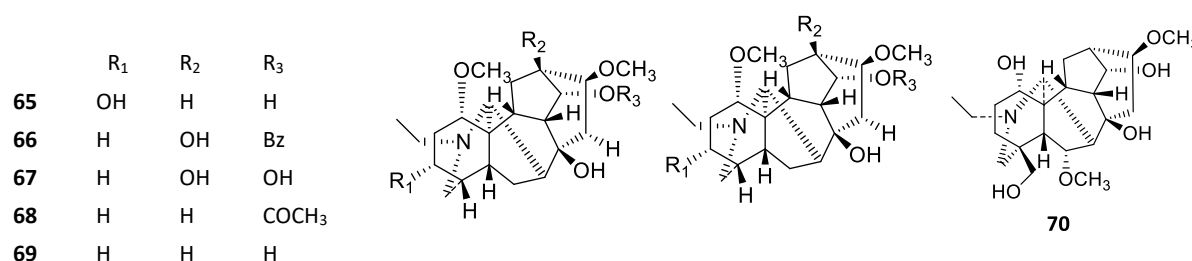
### 3. Új tudományos eredmények és tézisek

#### 3.1. Fitokémiai vizsgálatok és ezekhez kapcsolódó farmakológiai vizsgálatok

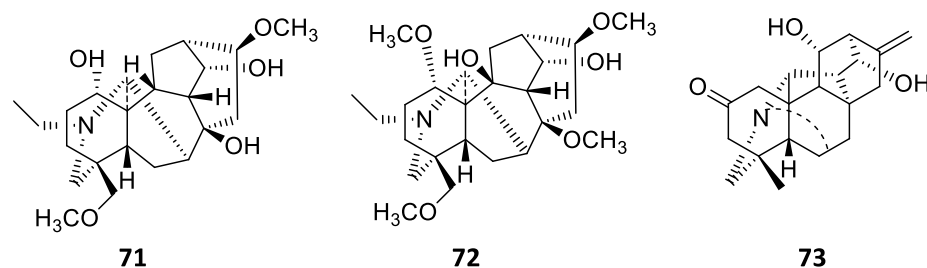
##### 3.1.1. *Aconitum* fajokból izolált diterpén-alkaloidok és félszintetikusan előállított lipoalkaloidok

Az *A. toxicum*, *A. anthora*, *A. moldavicum*, és az *A. napellus* subsp *firmum* fajokból összesen 22 diterpén-alkaloidot izoláltunk többlépéses kromatográfiás tisztítással és azonosítottunk spektrometriás (döntően NMR) módszerekkel. Több vegyület teljes NMR jelasszignációját elsőként közöltük, az NMR szignálok korábban közölt jelhozzárendelését több esetben korrigáltuk.<sup>1-4\*</sup>

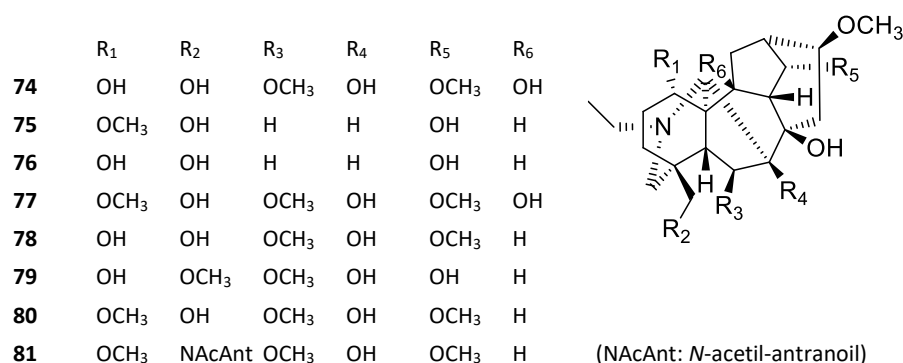
Az *A. toxicum*-ból kinyert akotoxin (65) elsőként általunk leírt, új természetes anyag. A delavakonin (67), a dolakonin (68), az akonozin (69) és a neolinin (70) teljes <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR jelasszignációját elsőként végeztük el, kiegészítve és korrigálva a korábban közölt adatokat.



Az *Aconitum anthora* gyökeréből elsőként írtuk le a 10-hidroxi-8-*O*-metiltalatizamin (71) jelenlétét, ezen kívül izoláltuk az izotalatizidint (72) és a hetizinon C<sub>20</sub>-alkaloidot (73).

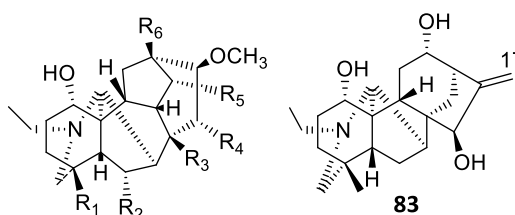


Az *Aconitum moldavicum* gyökeréből egy új akonitánvázis alkaloidot, az 1-*O*-dezmetil-szvatint (74), továbbá a már korábban ismert kammakonint (75), kolumbianint (76), szvatint (77), gigaktonint (78), delkozint (79), likoktonint (80) és ajacint (81) izoláltuk.



Az *A. napellus* subsp. *firmum* Rchb. gyökeréből 6 alkaloidot [neolin (**82**), napellin (**83**), izotalatizidin (**84**), karakolin (**85**), szenbuzin A (**86**), szenbuzin C (**87**)] izoláltunk, további kettőt [akonitin (**1**), taurenin (**88**)] pedig kimutattunk LC-MS módszerrel.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
<b>82</b>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	OH	H
<b>84</b>	COCH <sub>3</sub>	H	OH	H	OH	H
<b>85</b>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	OH	H
<b>86</b>	COCH <sub>3</sub>	OH	OH	H	OH	H
<b>87</b>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	OH	H
<b>88</b>	COCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OAc	OH	OBz	OH



Egy, a hagyományos kínai gyógyászatban alkalmazott faj, az *Aconitum carmichaelii* gyökerének tradicionális feldolgozása során végbemenő változásokat tanulmányozva megállapítottuk, hogy a diészter-típusú diterpén-alkaloidok hőkezelés során vizes közegben elbomlanak, és ezzel egyidejűleg jelentősen nő bizonyos apoláros vegyületek mennyisége.<sup>11\*</sup> Ezek részletes LC-MS<sup>n</sup> vizsgálatával összesen 26 lipoalkaloidot azonosítottunk, amelyek a genuin alkaloidok átészterezésével keletkeznek. Mivel célunk volt a lipoalkaloidok farmakológiai vizsgálata, módszert adaptáltunk fél-szintetikus előállításukra, amely segítségével összesen 15 vegyületet állítottunk elő, tisztítottunk meg és azonosítottunk további kísérletek céljára.<sup>12\*</sup> Elsődleges cél volt a gyulladáscsökkentő hatás vizsgálata, hiszen a feldolgozott drogokat legjellemzőbben ilyen céllal alkalmazzák.

**1. táblázat** *Aconitum carmichaelii* gyökérkivonatok (50 µg/ml) és alkaloidok (50 µM) COX-1-, COX-2- és 5-LOX- gátló hatásai

Minta	COX-1 gátlás (%±SD)	COX-2 gátlás (%±SD)	5-LOX gátlás (%±SD)
Feldolgozatlan sisakvirággyökér-kivonat	7,21±7,64	47,86±2,60	35,79±6,85
Feldolgozott sisakvirággyökér-kivonat	24,42±2,47	65,45±3,26	35,38±5,96
Akonitin ( <b>1</b> )	-4,25±4,64	9,96±8,31	-0,39±6,97
14-Benzoilakonin ( <b>4</b> )	-2,53±6,21	14,77±5,30	-6,03±6,52
Akonin ( <b>5</b> )	2,92±7,81	12,27±4,16	-5,57±9,55
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -laurát ( <b>166</b> )	-29,8±5,7	-8,0±5,6	33,5±11,2
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -mirisztát ( <b>167</b> )	-25,3±21,6	-4,0±15,1	35,9±9,8
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -sztearát ( <b>168</b> )	-33,5±39,3	-3,5±10,2	52,5±5,9
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -palmitát ( <b>169</b> )	1,6±2,8	4,2±4,9	25,8±5,8
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -palmitoleát ( <b>170</b> )	-18,8±8,7	17,1±9,0	34,5±6,5
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -oleát ( <b>159</b> )	-24,3±17,0	15,3±28,9	45,5±4,6
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -linoleát ( <b>158</b> )	2,6±6,7	72,2±3,2	19,6±6,8
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -α-linolenát ( <b>157</b> )	-5,9±20,7	22,0±7,8	48,0±1,9
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -γ-linolenát ( <b>171</b> )	-11,8±22,8	12,7±4,9	34,7±1,7
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -eikoza-	54,5±24,4	66,1±3,5	46,0±3,3
5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaenoát ( <b>172</b> )			
14-Benzoilakonin-8- <i>O</i> -dokoza-	15,1±24,2	40,2±8,8	61,0±7,9
4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoát ( <b>173</b> )			

A lipoalkaloidok lehetséges szerepére a gyulladáscsökkentő hatásban az is utalt, hogy a feldolgozott növényi kivonat COX-1 és -2 enzimet gátló hatása jelentősebb volt, mint a nyers kivonaté. A lipoalkaloidok közül a COX-1-gátlást vizsgáló tesztben a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikozapentaenoát

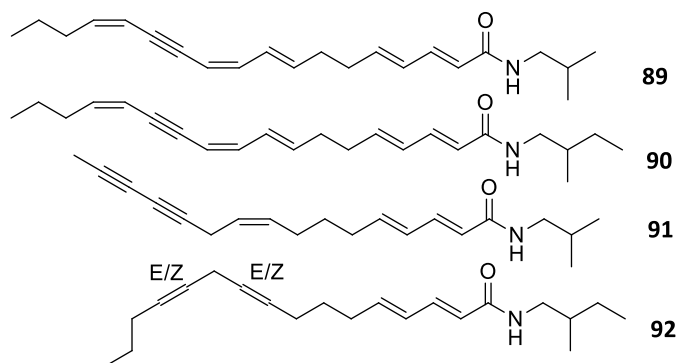
(**172**) fejtette ki a legnagyobb, a feldolgozott sisakvirággyökérét meghaladó gátló hatást, a többi vegyület hatása, lánchosszúságtól és telítetlenségtől függetlenül elhanyagolható volt (**1. táblázat**). A COX-2 tesztben a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikozapentaenoáton (**172**) kívül a 14-benzoilakonin-8-*O*-linoleát (**158**) mutatott kimagasló aktivitást, ezeket a dokozaheptaenoát-származék (**173**) követte. Az 1-3-szorosan telítetlen zsírsavakat tartalmazó vegyületek mérsékelt aktivitásúak voltak, míg a telített acilszubsztituenszt tartalmazók inaktívak voltak. Az LTB<sub>4</sub>-képződést vizsgáló tesztben mindegyik lipoalkaloid mutatott aktivitást. Legaktívabbnak a 14-benzoilakonin-8-*O*-dokozaheptaenoát (**173**) bizonyult, az észterező zsírsav lánchossza és a gátló aktivitás között gyenge korreláció volt megfigyelhető. A gyulladáscsökkentő lipoalkaloidok toxicitása ráadásul nagyságrendekkel elmarad az anyavegyületekétől, ami humán gyógyászati szempontból is perspektivikussá teszi tanulmányozásukat. Elsőként írtuk le a lipoalkaloidok gyulladáscsökkentő hatását, mutattunk rá lehetséges szerepükre az *Aconitum* drogok terápiás klinikai hatásaira és elsőként végeztünk átfogó farmakológiai vizsgálatot ezzel a vegyületcsoporttal.

Az általunk növényi mintából kinyert vagy előállított alkaloidok (összesen 48 vegyület) bioaktivitását a kardiotoxicitás szempontjából jelentős hERG-, az antiaritmiás felhasználás szempontjából perspektivikus GIRK-káliumioncsatornákon, valamint a Na<sub>v</sub> 1.2 nátriumioncsatornán is tanulmányoztuk.<sup>2-4,13,31\*</sup> A hERG ioncsatorna esetén >40% mértékű gátlás a genuin alkaloidok közül csak az akonitin (**1**) esetén volt megfigyelhető. Ez utóbbi megfigyelés egy adalék ahhoz, hogy miért tartják az akonitint a legtoxikusabb diterpén-alkaloidnak. A sisakvirágdrogok feldolgozása során potenciálisan képződő lipoalkaloidok (pontosabban azok általunk félszintetikusán előállított képviselői) és az akonitin (**1**) hőkezelésével keletkező piroakonitin (**11**) is alacsonyabb hERG-csatornagátló aktivitást mutattak, ami a hagyományos keleti gyógyászatban alkalmazott feldolgozás eredményességét támasztja alá.

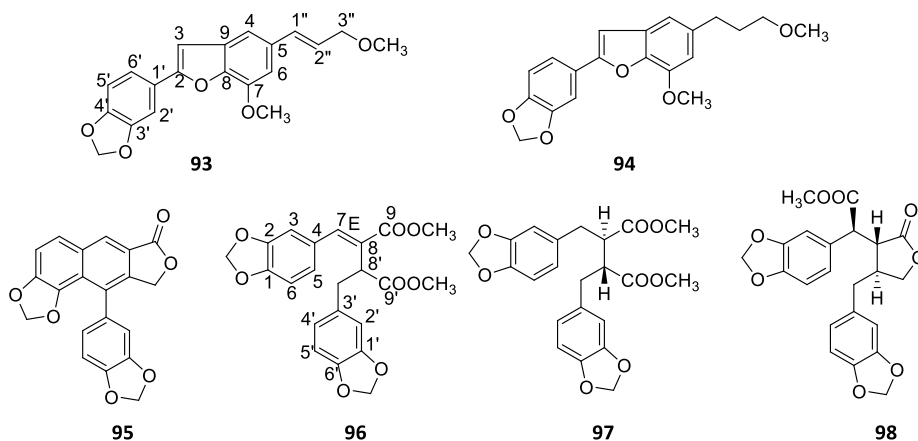
A diterpén-alkaloidok mérsékeltén gátolták a GIRK csatornákat. A félszintézissel előállított lipoalkaloidok átlagos GIRK-gátló hatása szignifikánsan jelentősebb volt, mint a diterpén-alkaloidoké. A zsírsavszubsztituens telítetlensége (és annak mértéke) döntő tényező az aktivitás szempontjából, legmagasabb aktivitás az eikozánsavészterek esetén volt mérhető. A legmarkánsabb GIRK-gátló hatással a 14-benzoilakonin-8-*O*- $\gamma$ -linolenát (**171**) és a **172** rendelkezett, ezek azonban a hERG-ioncsatornákat is gátolták. Két vegyület, a 14-benzoilakonin-8-*O*-eikoz-8Z,11Z,14Z-trienoát (**198**) és a 14-benzoilakonin-8*O*-eikoz-11Z,14Z,17Z-trienoát (**199**) igen jelentős GIRK-gátló hatással rendelkezett gyenge hERG-inhibícióval párosulva, ezért ezek további farmakológiai vizsgálatra érdemesek potenciális kardiovaszkuláris felhasználás reményével. A lipoalkaloidok GIRK/hERG szelektivitása szignifikánsan nagyobb volt, mint a diterpén-alkaloidoké. A Na<sub>v</sub> 1.2 csatornát gátló vegyületek közül az ajacin (**81**) és a delektinin (**187**) emelhető ki. A vegyületek zöme esetén elsőként közöltünk adatokat GIRK és hERG csatornákon kifejtett hatásokról, és elsőként vizsgáltunk diterpén-alkaloidokat Na<sub>v</sub> 1.2 csatornaaltípuson. Terápiás szempontból azok a vegyületek lehetnek perspektivikusak, amelyek elhanyagolható hERG-inhibíció mellett szelektíven gátolják a GIRK káliumioncsatornát, vagy a farmakológiai támadáspontként számításba vehető Na<sub>v</sub> 1.2 csatornákat.

### 3.1.2. *Heliopsis helianthoides*ből és *Lepidium meyenii*ből izolált alkilamidok és lignánok

A *H. helianthoides* var. *scabra* és a *L. meyenii* feldolgozásának fő célja *N*-alkil-amidok kinyerése volt. A *Heliopsis helianthoides* var. *scabra*ból egy ismert (**89**) és három új (**90-92**), 16, ill. 18 szénatomos, 3-6 kettős, illetve acetilénkötést tartalmazó zsírsavon alapuló izobutil- és metilbutilamidot nyertünk ki.<sup>5\*</sup>

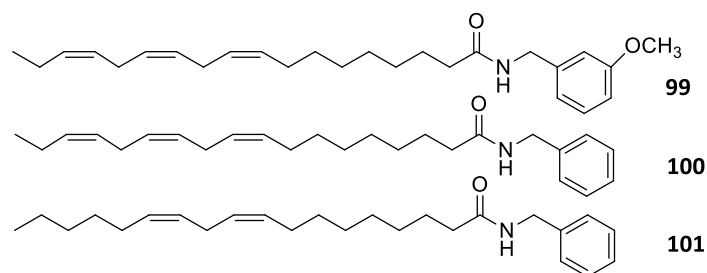


A növényből kinyert többi vegyület nem *N*-alkil-amid szerkezetű volt. Két új arilbenzofurán neolignánt, az 1''-dehidroegonol-3''-metilétert (**93**) és az egonol-3''-metilétert (**94**), valamint további négy ismert lignánt (**95-98**) is kinyertünk és azonosítottunk. A **95** vegyületet helioxantinként, a **96**-ot (7*E*)-7,8-dehidro-heliobuftalminként, a **97**-et heliobuftalminként, a **98** vegyületet 7-acetoxi-hinokininként azonosítottuk.



A *L. meyenii*ből izolált három vegyület mindegyike aromás szubsztituenst és többszörösen telítetlen (dién vagy trién) 18 szénatomos alifás láncot tartalmazó ismert makamid: *N*-(3-metoxibenzil)-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-oktadekatriénsavamid (**99**), *N*-benzil-(9*Z*,12*Z*,15*Z*)-oktadekatriénsavamid (**100**) és *N*-benzil-(9*Z*,12*Z*)-oktadekadiénsavamid (**101**).





A *L. meyeri*ből és a *H. helianthoides* var. *scabra*ból izolált *N*-alkil-amidok endogén kannabinoidrendszerre kifejtett hatását a CB<sub>1</sub> és CB<sub>2</sub> receptorokra, a FAAH és MAGL enzimekre, valamint az anandamidfelvételre való aktivitásával jellemeztük.<sup>6\*</sup> A vegyületek egyike sem gátolta a MAGL enzimet, ugyanakkor az összes *N*-alkil-amid mikromoláris koncentrációban – közülük legintenzívebben a **101** – gátolta a FAAH-t (**2. táblázat**). Utóbbi vegyület szubmikromoláris koncentrációban, a referenciaként használt OMDM-2 és UCM707 vegyületeknél markánsabban gátolta az anandamid visszavételét. A **101** vegyület nagy affinitással kapcsolódott a CB receptorokhoz, nagy (9-szeres) szelektivitást mutatva a CB<sub>1</sub> iránt. A *H. helianthoides* var. *scabra* vegyületei közül a **92** CB<sub>1</sub>-en kifejtett aktivitása figyelemre méltó leginkább.

**2. táblázat** Az izolált alkilamidok hatásai az endokannabinoid rendszerre<sup>a</sup>

Vegyület	Anandamid-visszavétel gátlása IC <sub>50</sub> (μM) (95% CI)	FAAH IC <sub>50</sub> (μM) (95% CI)	CB <sub>1</sub> K <sub>i</sub> (μM) (95% CI)	CB <sub>2</sub> K <sub>i</sub> (μM) (95% CI)
<b>89</b>	2,5 (1,28–4,70)	17,8 (13,18–25,70)	8,6 (2,39–10,92)	9,2 (5,41–9,84)
<b>91</b>	4,3 (2,69–6,97)	12,3	>20 (6,28–>20)	22,6 (12,68–25,30)
<b>92</b>	2,2 (0,87–5,31)	20,0 (12,59–33,11)	0,31 (0,18–0,59)	1,2 (0,90–1,71)
<b>99</b>	>100	19,1 (13,8–28,18)	8,7 (4,66–13,75)	>50
<b>100</b>	84,4 (72,44–>100)	11,5 (6,81–18,78)	8,9 (3,79–10,19)	44,0 (24,16–>50)
<b>101</b>	0,7 (0,47–0,97)	4,1 (2,95–5,62)	0,5 (0,33–0,67)	4,1 (3,11–5,66)
OMDM-2	4,12 (2,01 – 12,19)	23,29 (10,72 – 48,98)	n.d.	n.d.
UCM707	1,46 (1,18 – 1,80)	7,24 (6,03 – 13,18)	n.d.	n.d.

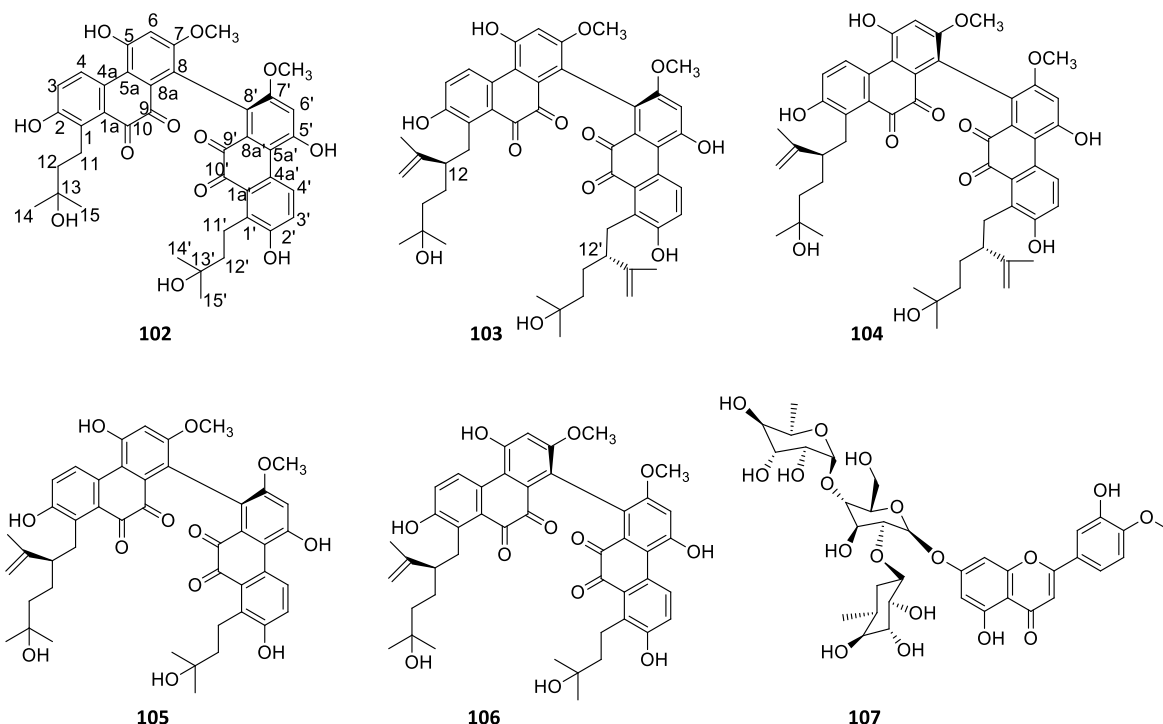
n.d., nem meghatározott.

A *Heliopsis helianthoides* var *scabra*ból izolált lignánok (**93–98**) áttétképződést gátló hatását *in vitro* melanoma agyi metasztázis modellen vizsgáltuk. Elsőként azt igazoltuk, hogy az elemzés alá vont vegyületek nem befolyásolják a sejt életképességét, azaz az eredményeket nem torzítja citotoxikus hatás. Egy sebgyógyulási tesztben kimutattuk, hogy **95** és **96** lignán gátolja a daganatsejtek migrációját, továbbá igazoltuk, hogy a **95** vegyület jelentősen csökkentette a melanómasejtek adhézióját az endotélréteghez. A két vegyület a BBB-funkció javításával mérsékelheti a metasztázis kialakulásának kockázatát, de ennek a hatásnak egyéb patológus állapotokban is jelentőség lehet.

### 3.1.3. *Paraleucobryum longifolium*ból izolált fenantrének

A mohafajokkal végzett vizsgálat alapja a növényi kivonatok antiproliferatív és antimikrobás hatásra való szűrése volt, ennek alapján választottuk ki részletes fitokémiai vizsgálatra a *P. longifolium*ot.<sup>30\*</sup> A moha metanolos kivonatából többlépéses kromatográfiás tisztítással összesen hat vegyületet (**102–107**) nyertünk ki.<sup>7\*</sup> Ezek között öt, korábban nem ismert fenantrént (leukobrin A–E, **102–105**), valamint a diozmetin 7-*O*-[2,4-di-*O*-(α-*L*-ramnopiranozil)]-β-*D*-glükopiranozidot

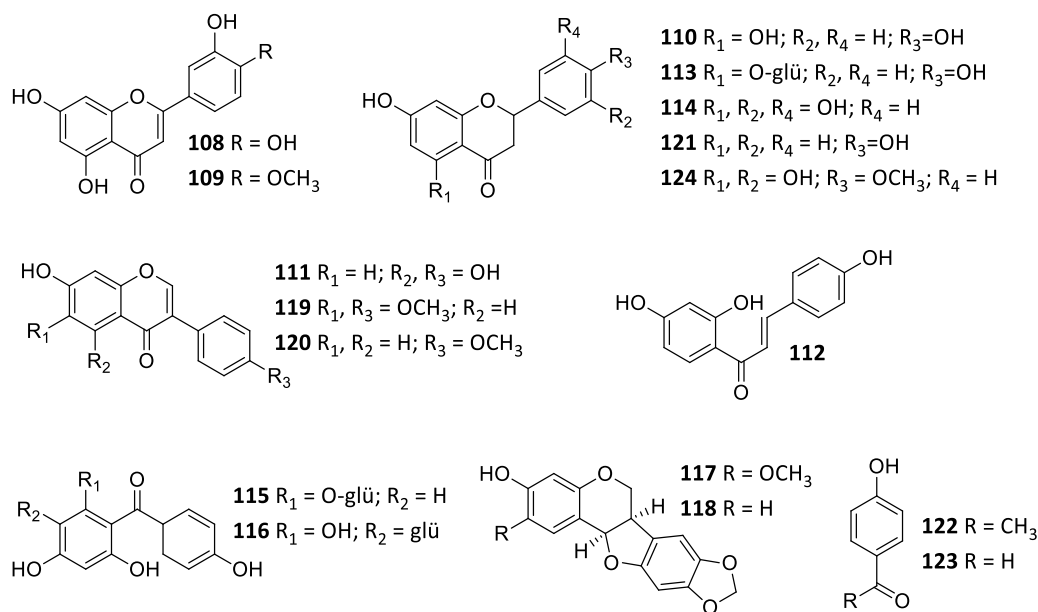
(**107**) izoláltuk és azonosítottuk. A leukobrinek (**102–105**) az első természetes 9,10-fenantrénkinon dimerek, amelyek monomerjei a C-8 szénatomjaikon keresztül kapcsolódnak. A leukobrin B–E (**103–106**) rendhagyó C<sub>10</sub> monoterpén oldalláncot tartalmaz, amelyekben az izoprénegységek 3,4 kapcsolódásúak. A leukobrin A (**102**) és B (**103**) mérsékelt *in vitro* antiproliferatív hatást mutatott.



### 3.1.4 *Cyclopia genistoides*ből izolált polifenolos vegyületek

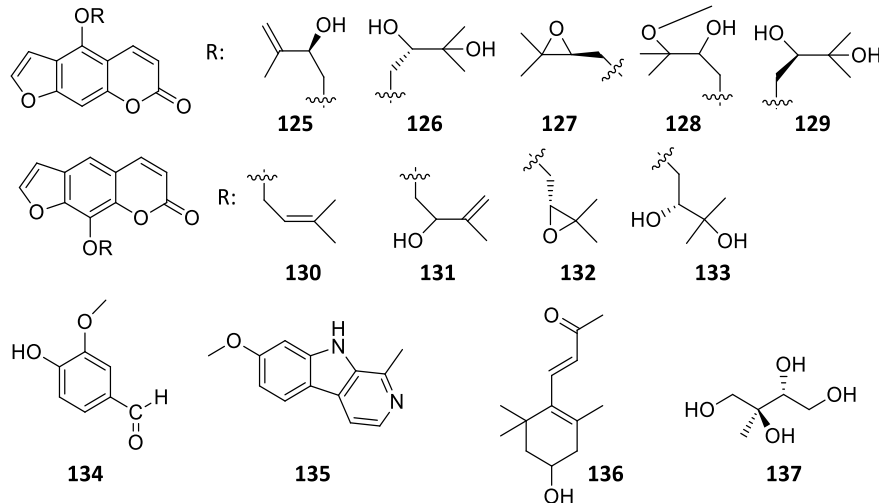
A *C. genistoides* fermentált és nem fermentált herbáját ösztrogénszerű és xantin-oxidásgátló hatásra irányuló, hatáskövetett frakcionálással dolgoztuk fel, ami 17 vegyület izolálását eredményezte. Tizennégy vegyületet először izoláltuk a fajból [dizometin (**109**), naringenin (**110**), genisztein (**111**), izolikviritigenin (**112**), helikrizin B (**113**), 5,7,3',5'-tetrahidroxiflavánon (**114**), iriflofenon 2-*O*- $\beta$ -glükopiranozid (**115**), (-)-2-metoximaackiain (**117**), (-)-maackiain (**118**), afrormozin (**119**), formononetin (**120**), likviritigenin (**121**), piceol (**122**), 4-hidroxibenzaldehid (**123**)], ezeken kívül a luteolint (**108**), az iriflofenon-3-*C*- $\beta$ -glükopiranozidot (**116**) és a heszperetint (**124**) nyertük ki és azonosítottuk.<sup>8,9\*</sup>

A kivonatok frakciók és tiszta vegyületek ösztrogénszerű hatását transzgenikus növényi pER8:GUS rendszerben mértük. Az ösztrogénszerű aktivitással rendelkező vegyületek (**108**, **110–114**) kvantitatív összehasonlítását elvégeztük a fermentált és nem fermentált *C. genistoides* kivonatokban HPLC alkalmazásával. Két vegyület, a luteolin és dizometin (**108** és **109**) figyelemreméltó XO-gátló hatást mutatott (IC<sub>50</sub> 0,84  $\mu$ M és 0,53  $\mu$ M).



### 3.1.5. Ducrosia anethifoliából izolált furokumarinok

A *D. anethifolia* herbájának metanolos kivonatából többlépéses kromatográfiás elválasztással 12 vegyületet nyertünk ki tiszta formában.<sup>10\*</sup> Kilenc lineáris furokumarint, a pabulenolt (**125**), a (+)-oxipeucedanin hidrátot (aviprin) (**126**), az oxipeucedanint (**127**), az oxipeucedanin-metanolátot (**128**), az (-)-oxipeucedanin-hidrátot (prangol) (**129**), az imperatorint (**130**), az izogoszferolt (**131**), a heraklenint (**132**) és a heraklenolt (**133**) nyertük ki és azonosítottuk a növényből.



Ezen kívül egyéb szekunder metabolitokat, így vanillil-aldehidet (**134**), harmint (**135**), 3-hidroxi- $\alpha$ -ionont (**136**) és 2-C-metil-eritritolt (**137**) is izoláltunk a *D. anethifolia* herbájából. A **126**, **127**, **129** és **131** vegyületeket elsőként írtunk le ebben a fajban.

A potenciális daganatellenes hatásra irányuló komplex kísérletsorozatban az oxipeucedanin (**127**) fejtette ki a legmarkánsabb *in vitro* antiproliferatív és citotoxikus hatást PAR (IC<sub>50</sub> = 25,98  $\mu$ M és 40,33  $\mu$ M) és MDR sejteken (IC<sub>50</sub> = 28,89  $\mu$ M és 66,68  $\mu$ M), és ez a vegyület mérsékelt multidrogrezisztencia-csökkentő hatást is mutatott az ABCB1 gátlásával. Az

oxipeucedanin (**127**) és a heraklenin (**132**) szinergista módon fokozták a doxorubicin daganatsejtellenes hatását.

### 3.2. Kvalitatív és kvantitatív fitoanalitikai vizsgálatok

#### 3.2.1. *Rhodiola* minták fenilpropenoid- és flavonoidtartalmának változékonysága

Kísérleteinkben dél-angliai és alpesi körülmények között termesztett növények kémiai összetételét és az ezeket befolyásoló tényezőket vizsgáltuk. A kísérlet elsődleges célja a növényi rész, a begyűjtési idő és a növények kora, valamint az összrozavin- ( $ROZ_{tot}$ ), össz-fenilpropenoid- ( $FP_{tot}$ ), össz-szalidrozyd- ( $SZAL_{tot}$ ) és fahéjalkoholtartalom (FA) közötti összefüggés vizsgálata volt.<sup>15,16\*</sup>

A *Rhodiola rosea* gyöktörzs gyökérhez viszonyított magasabb fenilpropenoid-tartalmát első alkalommal igazolta szisztematikus vizsgálat. A két drog közötti különbség a szaporítóanyag származási helyétől függetlenül érvényes volt az alpesi mintákban. Ennek fényében célszerűbb lenne, ha a termékgyártásban a két növényi részt elkülönítve, vagy ismert arányban dolgoznák fel.

Fahéjalkoholtartalom szempontjából korábban nem végeztek szisztematikus vizsgálatot. Megállapítottuk, hogy a fahéjalkohol-tartalom a rozavintartalommal párhuzamosan változik a begyűjtési időt és a növények korát tekintve. Az észak-európai minták fahéjalkohol-tartalma magasabb volt, mint a közép- és dél-európaiaké, ami genetikai determináltságra utalhat. Ezt a vegyületet jellemzően nem alkalmazzák a növényi minták minősítésére, ugyanakkor mivel biogenetikai szempontból is jelentősége van, továbbá mivel a növény hatásában betöltött szerepe ismeretlen, indokolt lenne változtatni ezen a gyakorlaton. Mivel a fahéjalkohol a tárolás, feldolgozás során bomlástermékként is keletkezhet, stabilitási, tárolási vizsgálatokban is jelentősége lehet a vegyületnek. Megfontolandó az összrozavin-tartalomba ezt az aglikont is bevonni, mivel a bélrendszerben a glikozidok hidrolízise eredményeként a rozavintartalom egy részének is ez az aktív, felszívódó formája.

Az egyes tartalomanyagok abszolút értéke begyűjtési időtől és a növény korától, valamint egyéb tényezőktől is függ, azonban az összes minta vizsgálatával megállapítottuk, hogy a *R. rosea* gyöktörzsére jellemző a  $> 2:1$   $FP_{tot}$ – $SZAL_{tot}$  arány. Ennek meghatározásával azonosíthatóak azok a minták, amelyek a nemzetség más fajaitól származnak, de azok a termékek is, amelyek különböző *Rhodiola* fajok mintáinak keverékét tartalmazzák. A gyöktörzs kb. 1,5–3-szor magasabb  $ROZ_{tot}$ -tal jellemezhető, FA esetén ez az arány  $\sim 2:1$ . A föld feletti részben a vizsgált anyagok szintje nagyon alacsony, vagy a kimutatási határ alatti.

Elsőként végeztünk szisztematikus vizsgálatot *Rhodiola* minták flavonoidtartalmára vonatkozóan.<sup>17\*</sup> A fenilpropenoidok és feniletanoidok analitikai vizsgálata során azonosított két flavonoid, a rodiozin és herbacetin mennyiségi arányait különböző helyről származó mintákban elemeztük, illetve vizsgáltuk a kivonás és szárítás hatását is az extraktumok flavonoidtartalmára. A magas etanoltartalmú kivonószerek alkalmasak a flavonoidok extrahálására, a szárítási hőmérséklet (a vizsgált tartományban) nem volt befolyással a kinyerhető mennyiségre, ami a vegyületek jó kémiai stabilitására utal. Megállapítottuk, hogy a gyökerek flavonoidtartalma

magasabb a gyöktörzsekénél, és azt is, hogy bár az abszolút mennyiségek széles tartományban mozoghatnak, a két vizsgált flavonoid egymáshoz viszonyított aránya meglehetősen állandó.

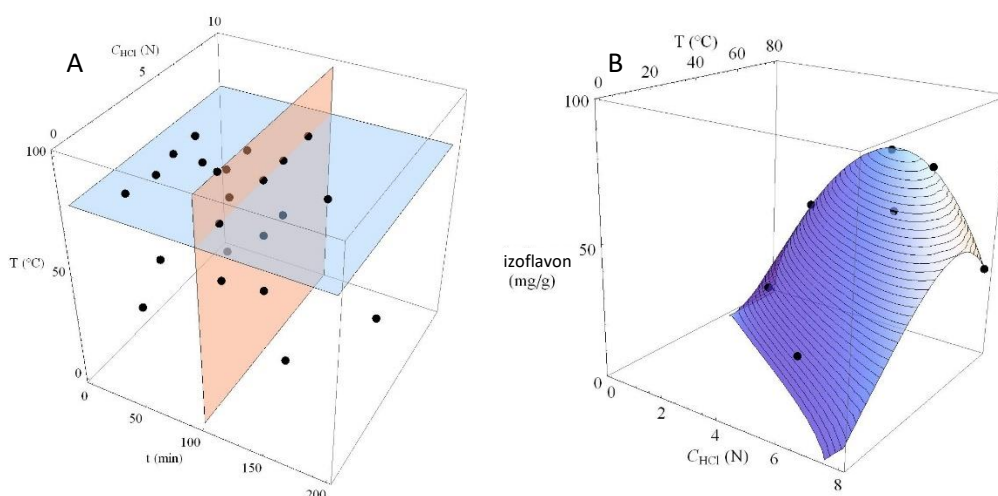
### 3.2.2. Teaminták teanin- és koffeintartalmának vizsgálata

A teaminták L-teanintartalmának mérésére validált denzitometriás<sup>18\*</sup> és HPLC-DAD módszert<sup>19\*</sup> dolgoztunk ki. Az L-teanin és koffein szimultán mérésére fordított fázisú állófázist alkalmazó, származékképzés nélküli, egyszerű és gyors módszert dolgoztunk ki. Módszerünkkel 38 kereskedelmi teaminta L-teanin- és koffeintartalmát határoztuk meg.<sup>20\*</sup> A fehértea-minták esetén az L-teanintartalom átlagosan 6,26 mg/g volt, míg a koffeinkoncentráció 16,79 mg/g (koffein/L-teanin arány 3,07). A fekete teák kisebb mennyiségű L-teanint (5,13 mg/g) és valamivel több koffeint (17,77 mg/g) tartalmaztak, így a koffein/L-teanin arány valamivel magasabb volt (4,07). A zöld teák tartalmazták a legtöbb L-teanint (6,56 mg/g), és mivel koffeintartalmuk az előzőekhez hasonló volt (16,28 mg/g), a koffein/L-teanin arány ez esetben jelentősen alacsonyabb volt (2,79). Az oolong teák L-teanintartalma 6,09 mg/g volt 19,31 mg/g koffeintartalom mellett (koffein/L-teanin arány 4,20). A pu-erh teában nem volt kimutatható L-teanin.

Eredményeink azt támasztják alá, hogy pusztán az L-teanin és a koffein koncentrációja, ezek aránya alapján az egyes teatípusok (a pu-erh kivételével) nem különböztethetők meg, azonban a fermentálás kétségtelenül hatással van (csökkenti) a teanintartalomra, ezáltal a központi idegrendszeri hatásra is, mivel a koffeinnel ellentétben a teaninnak relaxáló hatása van.

### 3.2.4. Szójaminták izoflavontartalmának vizsgálatára alkalmas módszer optimálása

Az izoflavonok (genisztein, daidzein, glicitein) analízisére HPLC módszert adaptáltunk.<sup>21\*</sup> A glikozidok és egyéb származékok aglikonná alakításához savas hidrolízist alkalmaztunk. A folyamatra leginkább a sav koncentrációja, a hőmérséklet és az idő van befolyással, ezért ezek hatásait vizsgáltuk az összizoflavon-tartalomra. Mérési eredményeinket térbeli koordináta-rendszerben ábrázoltuk a savkoncentráció, a hidrolízisidő és a hőmérséklet függvényében. Mivel általános modell a folyamatra nem ismert, ezért az adatokhoz az előzetes empirikus elemzések alapján kiválasztott polinomokat lokálisan illesztettük.



**1. ábra** Rögzített változók (80 °C, 100 perc) kijelölése (A) és 100 percig tartó hidrolízis során nyert izoflavonmennyiségek a savkoncentráció és a hőmérséklet függvényében (B)

A mérések eredményei arra utaltak, hogy magas hőmérsékleten (80 °C) vagy kb. 100 percig történő hidrolízissel nyerhető ki nagy mennyiségű izoflavon, ezért előzetes számításaink során ezen két értéket rögzítettük (**1 (A). ábra**). A 100 percig tartó hidrolízisek eredményeit a savkoncentráció és hőmérséklet függvényében és az adatokhoz illesztett felületet együttesen ábrázolva a **1 (B). ábra** mutatja. A függvény rögzített hőmérséklet mellett a savkoncentráció növelésével jól lokalizálható maximumot ad. Az illesztett polinom maximum értékét (74,47 mg/g)  $T = 82,94$  °C-on és  $c_{HCl} = 4,60$  N-on veszi fel.

Az előzetes illesztések alapján a teljes adathalmazra  $c^{d1} (a_0 + a_1 c + b_1 c^2 + a_2 t + c_1 t + b_2 t^6 + a_3 T + c_2 T + b_3 T^4)$  alakú négyváltozós függvényt illesztettünk. Ezen az látható, hogy a függvényérték a savkoncentrációhoz és a hőmérséklethez képest kevésbé függ az időtől. Az elméletileg maximálisan kinyerhető izoflavonmennyiségre vonatkozó eredmény validálására az optimális körülmények között előkészített mintával végzett mérések igazolták, hogy a modellünk által jóslott maximális értékek a valóságban is kinyerhetők. Tekintettel arra, hogy az izoflavonok biológiailag hasznosuló formái a bélrendszerben a  $\beta$ -glükozidáz enzimek segítségével képződő aglikonok, az izoflavonszármazékok hidrolízise és az aglikonok mérése pragmatikus megközelítés.

### 3.2.5. Édesköményminták furokumarintartalmának vizsgálata

A fűszerként és gyógynövényként alkalmazott édeskömény biztonságos alkalmazásával kapcsolatos aggodalmak részben a növény furokumarin-tartalmával függenek össze. LC-MS módszert dolgoztunk ki az édesköményből korábban leírt három furokumarin (pszoralén, bergaptén és imperatorin) elválasztására, kimutatására és mérésére, majd 33 édesköményminta furokumarintartalmát vizsgáltuk.<sup>22\*</sup> Az imperatorin mennyisége mindegyik mintában kimutatási határ alatt volt, 7 mintában egyik vegyületet sem detektáltuk. A pszoralén 19, a bergaptén 7 mintában nem volt kimutatható. Utóbbi vegyület mintegy egy nagyságrenddel nagyobb koncentrációban fordult elő a mintákban, mint a pszoralén. Ennek a két vegyületnek a mennyiségét az Európai Gyógyszerügynökség által javasolt legnagyobb terápiás napi édeskömény-adagban (7,5 g) 0,0099–1,2209  $\mu\text{g}/7,5$  g-nak mértük.

Az édeskömény termés furokumarintartalmára vonatkozóan elsőként végeztünk szisztematikus vizsgálatokat az általunk kidolgozott LC-MS módszerrel, amelynek eredményeként megállapítottuk, hogy az általunk vizsgált minták egyikében sem haladja meg a maximális napi dózis furokumarintartalma az 1,23  $\mu\text{g}$ -t. A potenciális karcinogén és genotoxikus vegyületekre, amennyiben gyógyszerek szennyezőiként vannak jelen, 1 hónapot meg nem haladó kezelés esetén napi maximum 120  $\mu\text{g}$ , tartós kezelés esetén pedig napi 1,5  $\mu\text{g}$  felső limitet javasolnak. A vizsgált minták furokumarintartalma egy esetben sem érte el a meghatározott legalacsonyabb biztonságossági limitet, így kutatásaink arra utalnak, hogy az édeskömény terápiás alkalmazása a furokumarintartalmat tekintve biztonságos.

### 3.2.6. Máriatöviskészítmények réztartalmának vizsgálata

A Wilson-kór célzott gyógyszeres kezelése mellett, a rézfelhalmozódással összefüggő májkárosodás nem-specifikus prevenciójára gyakran alkalmaznak máriatövis-készítményeket.

Mivel a máriatövis rézfelhalmozó növény, célul tűztük ki összesen 15, különböző feldolgozottsági fokú, kereskedelmi forgalomban elérhető termék réztartalmának vizsgálatát induktív csatolású plazma tömegspektrométer (ICP-MS) segítségével.<sup>23\*</sup> A vizsgált termékek napi adagjainak réztartalma 0,01–114,18 µg között változott. A deklarált szilimarintartalmú minták (S1-8 és S15) réztartalma viszonylag alacsony volt (0,01–3,51 µg a napi dózisban), azonban a részletesebben nem jellemzett, feltehetőleg nyers kivonatot tartalmazó minta (S13), valamint az őrölt termést tartalmazó termékek (S9, 10, 12, 14) nagyságrendekkel magasabb réztartalommal voltak jellemezhetőek (36,04, illetve 12,04–114,18 µg).

Eredményeink rámutattak arra, hogy alapvető jelentőségű, hogy a növény termését milyen feldolgozottsági szintű és milyen jogi kategóriába sorolható készítmény formájában alkalmazzák. A termékek réztartalma tág határokon belül (0,01–114,8 µg a napi adagban) mozog. A magas réztartalmú termékekben található réz mennyisége összevethető nagyságrendű a rézszegény diéta réztartalmával. Mivel egyértelműnek tűnik, hogy a termékgyártás során alkalmazott extrakció és a tisztítási lépések hatással vannak a réztartalomra, Wilson-kórosoknak előnyben részesítendő a magas feldolgozottsági fokú, szilimarinnal dúsított és standardizált készítmények (ezek napi dózisa 0,01-3,51 µg rézet tartalmazott). Ezen belül is előnyt élveznek a gyógyszerek, amelyek esetén a gyártási folyamat standardizáltsága is garancia arra, hogy a réztartalomban sem lehetnek nagy ingadozások.

### 3.2.7. Növényi kivonatokat tartalmazó készítmények minőségvizsgálata

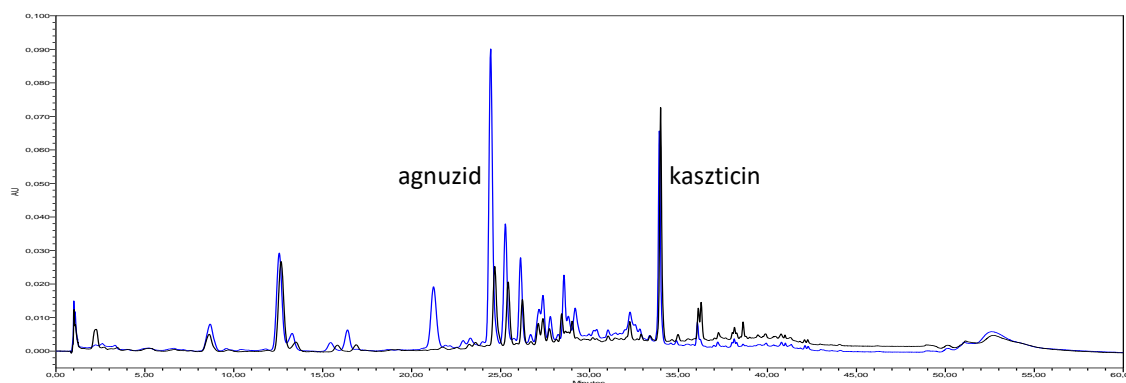
Az étrend-kiegészítők körében megfigyelhető gyakori minőségi problémákra fókuszálva testsúly-csökkentésre szánt termékek minőségvizsgálatát célzó, a szibutramintartalom szűrésére irányuló többlépcsős vizsgálatot dolgoztunk ki.<sup>25\*</sup> Az azonosítási vizsgálat első lépései a színreakciók, amelyet rétegekromatográfiás vizsgálat, HPLC-DAD-, majd tömegspektrometriás vizsgálat követ. Ez a több lépéses analitikai protokoll lehetővé teszi a műszerezettségnek megfelelő, gyors, lépcsőzetes szűrést.

A grapefruitmag-kivonatot tartalmazó készítmények vizsgálatára kidolgozott módszer célja a deklarált növényi anyag és az esetleges jellemző szennyezők kimutatása volt. Rétegekromatográfián és HPLC-vizsgálaton alapuló protokollt dolgoztunk ki a grapefruitmagra jellemző limonoidok kimutatására.<sup>26\*</sup> Hat kereskedelmi minta analízise során mindössze két termékből tudtuk kimutatni a grapefruit fő limonoidjait. További cél volt a szennyezésként vagy hamisítási céllal felhasznált grapefruithéj kimutatása a kumarintartalom szűrésével (három szennyezett terméket azonosítottunk). A vizsgálat harmadik lépcsője az antiszeptikus hatás fokozására fel nem tüntetett összetevőként hozzáadott szintetikus tartósítószer-tartalom meghatározása volt. Egy termékből nagy mennyiségben hozzáadott benzetónium-kloridot nyertünk ki és azonosítottunk.

A *Hoodia gordinii*-vel kapcsolatos kutatásainkat egy mellékhatásbejelentés (szívdobogás-érzés, vérnyomásemelkedés) kapcsán kezdtük el. Megvizsgáltuk a hatás mechanizmusát, valamint azt, hogy az valóban a *H. gordinii*-hoz köthető-e, vagy valamely, illegálisan hozzáadott vegyülethez.<sup>33\*</sup> A termék kémiai analízise során tömegspektrometriás vizsgálattal igazoltuk, hogy az a feltüntetett növényi nyersanyagból készült, és nem tartalmazza a vizsgált (hamisításra

gyakran használt) szintetikus vegyületeket. A humán alkalmazás során tapasztalt mellékhatás vizsgálatára szervfűrdőben végzett kísérletek során a termék patkány méhizomzatra kifejtett hatását tanulmányoztuk. A termék jelentős és koncentrációfüggő relaxációt váltott ki spontán és a stimulált összehúzódások esetén is. A spontán kontraktilitás gátlása szignifikánsan csökkent a nem szelektív  $\beta$ -adrenoreceptor antagonistá propranolol jelenlétében, ami alapján a szimpatomimetikus hatás jelentős részben  $\beta$ -receptor által mediált hatásnak tekinthető. Ez a hatás és az ebből eredő mellékhatások mechanizmusa hasonló több, ma már a forgalomból kivont fogyasztószeréhez, így eredményeink rámutatnak a növény alkalmazásának potenciális kockázataira.

Egy kísérlet keretében két, barátcserje (*Vitex-agnus castus*) alapú gyógyszert hasonlítottunk össze két markervegyület, az agnuzid és a kaszticin azonosításán és mérésén alapuló HPLC vizsgálattal.<sup>27\*</sup> Az egyik termék allopatíás, a másik homeopátiás gyógyszer volt. A két termék ujjlenyomat-kromatogramja (**2. ábra**) nagyon hasonló volt. Az allopatíás termék és a homeopátiás termék napi dózisának átlagos agnuzidtartalma 100,82  $\mu\text{g}$  illetve 25,19  $\mu\text{g}$ , míg a napi dózisok átlagos kaszticin-tartalma 42,95  $\mu\text{g}$  és 47,03  $\mu\text{g}$  volt. Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a homeopátia nem egy egységes gyógyászati rendszer, amelynek jogi szabályozása azt is lehetővé teszi, hogy a termékek allopatíás dózisú hatóanyagot tartalmazzanak.



**2. ábra** Allopatíás (kék) és homeopátiás (fekete) *Vitex agnus-castus* tartalmazó termékek HPLC-kromatogramja (254 nm)

### 3.3. Természetes anyagok hatásossága és biztonságossága

#### 3.3.1. Pirrolizidin-alkaloidok felszívódásával kapcsolatos vizsgálatok

A közismert májkárosító hatással rendelkező pirrolizidin-alkaloidokat tartalmazó fekete nadálytő biztonságos alkalmazásának reális értékeléséhez elengedhetetlenül szükségesek a külsőleges alkalmazással kapcsolatosan releváns farmakokinetikai vizsgálatok. Munkánk keretében mesterséges membránon és humán epidermiszen tanulmányoztuk a fekete nadálytő egyik fő alkaloidjának, a modellvegyületnek tekintett likopszaminnak a felszívódását Franz diffúziós cella és LC-MS alkalmazásával.<sup>28-29\*</sup> A likopszamin átdiffundált mennyisége telítési görbével jellemezhető, a szintetikus membrán esetén valamivel magasabb értékekkel (a felületre felvitt össz mennyiség 0,11–0,72% versus 0,04%–0,22%-a az epidermisz esetén). A humán epidermiszen



megfigyelt penetrációs arány meglehetősen alacsony, ráadásul az intakt bőrön való felszívódás ennél alacsonyabb lehet. Az általunk nyert, humán relevanciájú adatok hozzájárulhatnak ahhoz, hogy a jelenleg érvényesnél reálisabb határértéket szabjanak meg külsőleges készítmények pirrolizidinalkaloid-tartalmára.

### 3.3.2. Római kamilla görcsoldó hatásának vizsgálata

A római kamilla népi gyógyászatban megfigyelt görcsoldó hatását *in vitro* vizsgálatokban tanulmányoztuk, figyelemmel az ezért felelős vegyületekre és mechanizmusokra is.<sup>34\*</sup> A vizsgálatok alapjául szolgáló kivonat fő összetevői flavonoidok voltak, az eupafolin koncentrációja volt a legmagasabb, ezt követte a luteolin, hiszpidulin és apigenin. A vizsgálatok során nyers kivonatot, annak különböző flavonoidtartalmú frakcióit, a tiszta vegyületeket és a növény illóolajának hatását is vizsgáltuk különböző, állati és humán simaizom-preparátumokon. A nyers kivonat átmeneti kontrakciót okozott, ami a magasabb flavonoidtartalmú frakciók esetén mérsékeltebb volt. A kísérletek fókuszában a feltételezett spazmolitikus hatás állt, amely dóziszfüggő volt és mértéke arányos volt a kivonat/frakció flavonoidtartalmával, és a tiszta flavonoidok is relaxáló hatásúak voltak. A növény illóolaja nem fejtett ki kontraháló hatást, relaxáló aktivitással azonban rendelkezett. A spazmolitikus hatás mechanizmusára irányuló vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a hatás közvetlenül a simaizmon alakul ki.

Eredményeink kísérletes bizonyítékokat szolgáltatnak a római kamilla tapasztalati alapon feltételezett simaizomgörcs-oldó hatásához és magyarázatot adhatnak az emésztési panaszok esetén tapasztalt hatásosságra. Rámutattunk a kivonatok és a flavonoidok kettős (átmeneti kontrakciót követő tartós relaxáció) hatására a simaizmokon, s igazoltuk, hogy az összehatásban az illóolaj relaxáló hatása is szerepet játszik.

### 3.3.3. Centaurea fajok sebgyógyító és gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata

A *Centaurea sadleriana* föld feletti részének főzetét juhok sebeinek gyógyítására alkalmazták és alkalmazzák napjainkban is Jakabszállás (Bács-Kiskun megye, Magyarország) környékén. A népi gyógyászati felhasználás racionalitását vizsgálva a *C. sadleriana* sebgyógyulásra kifejtett hatását állatkísérletben tanulmányoztuk. <sup>36\*</sup> A növényi kivonat hexános frakciója frakció szignifikánsan rövidítette a sebgyógyulás idejét a placebohoz képest. A többi vizsgált frakció esetén mérsékelt, statisztikailag nem szignifikáns kedvező hatás volt tapasztalható. A hatásos frakció többlépéses kromatográfiás tisztításával 7 tiszta vegyületet nyertünk ki, amelyek szerkezetét spektroszkópiás módszerekkel  $\gamma$ -linolénsavként,  $\alpha$ -linolénsavként, sztigmaszterinként,  $\beta$ -szitoszterinként, kampeszterolként, pektolinarigeninként és szalvigeninként azonosítottuk. A kloroformos frakcióból további 4 vegyületet (vanillin, hiszpidulin, krizoeriol és apigenin) izoláltunk és azonosítottunk. A különböző polaritású kivonatok COX-1, COX-2 és 5-LOX gátló aktivitásait *in vitro* tesztrendszerben vizsgáltuk. Míg a vizes és metanolos kivonat nem mutatott aktivitást, a kloroformmal és a hexánnal készült extraktum mindhárom tesztben jelentős gyulladáscsökkentő hatást fejtett ki. A hexános frakció alfrakcióinak gyulladáscsökkentő hatását *in vivo*, karragén-indukált patkánylábödémát mérséklő hatás mérésével határoztuk meg. Több alfrakció jelentős

gyulladáscsökkentő hatást mutatott orális vagy intraperitoneális adagolást követően. A *C. sadleriana*-hoz hasonlóan ígéretes fajok azonosításának céljával vontunk vizsgálat alá 10 további fajt.<sup>37\*</sup> Ezek *n*-hexánnal nyert frakciói markáns COX-1 és COX-2-gátló hatást mutattak.

A *Centaurea sadleriana* népi gyógyászati felhasználását elsőként dokumentáltuk a szakirodalomban. Vizsgálataink keretében igazoltuk, hogy egy, a népi gyógyászatban sebkezelésre használt növény kivonata hatékonyan elősegítette a sebgyógyulást egy állatkísérletes modellben, amiben szerepet játszhat gyulladáscsökkentő hatása. A nemzetség több fajáról kimutattunk *in vitro* gyulladáscsökkentő hatást, 11 vegyületet pedig először írtunk le a *C. sadleriana*-ban.

### 3.3.4. Parlagfű szubakut toxicitási vizsgálata

Bár a parlagfűvet elterjedten alkalmazzák gyógynövényként, biztonságosságát tapasztalati vagy kísérletes adatok nem támasztják alá. Munkánk célja a parlagfű szubakut toxicitási vizsgálatának elvégzése volt patkányokon.<sup>38\*</sup> A vizsgálat fő végpontjai a klinikai tünetek, a testtömeg és a szervek tömegeinek változásai, valamint a laborparaméter-változások voltak. Az állatok növekedésében és a klinikai megfigyelések során nem észleltünk szignifikáns különbséget a csoportok között. Szignifikáns eltéréseket figyeltünk meg a májműködéssel összefüggő enzimek (AST, ALT) aktivitásában, valamint a karbamid és a kreatinin plazmakoncentrációjában a kezelés hatására. A relatív szervtömegek közül a máj teljes testtömeghez viszonyított tömege dóziszfüggően és szignifikánsan csökkent, míg az agy relatív tömege szignifikánsan nőtt a kontroll csoporthoz képest. Az AST és ALT növekedése májkárosodásra utalhat, a karbamid- és kreatininszint növekedése vesekárosodásra utalhat.

A potenciális vesekárosodásra utaló hatást elsőként dokumentáltuk. A káros hatások összefüggésben állhatnak a parlagfűben található szeszkviterpén-laktonokkal, amelyek közül többnek citotoxikus hatását korábban leírták. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a parlagfű humán alkalmazásának feltétele a potenciális károsító hatások kizárása lehet, ehhez azonban klinikai megfigyelések szükségesek.

### 3.3.5. Növényi termékek hatásosságának vizsgálata metaanalízisekkel

A növényi kivonatokkal végzett klinikai vizsgálatok metaanalíziseinek készítését az a felismerés ösztönözte, hogy a növényi termékekkel végzett ilyen jellegű vizsgálatok száma alacsony, és azok egy része is módszertani hibákkal terhelt. A leggyakoribb hiba az, hogy a vizsgálatokban alkalmazott faj azonosságán túl a metaanalízisek szerzői nincsenek tekintettel arra, hogy az egyes vizsgálatokban gyakran egészen eltérő módon készített, ebből következően eltérő összetételű kivonatokat alkalmaztak. Vizsgálataink során különös figyelmet fordítottunk a tanulmányozott termékek minőségi-mennyiségi összetételbeli jellemzőire.

Ennek megfelelően a barátcserje hatásosságát vizsgáló metaanalízisbe olyan vizsgálatokat vontunk be, amelyekben megfelelően jellemzett kivonatokat tartalmazó *Vitex agnus-castus* termékek hatásosságát placebóhoz viszonyították a premenstruációs szindróma tüneteinek enyhítésében.<sup>39\*</sup> Az elemzésbe két kivonatot vizsgáló 3 tanulmány került be. A teljes betegcsoportban a növényi kivonat alkalmazása esetén szignifikánsan nagyobb esély volt a

tünetek enyhülésére, és az alcsoport-analízisek is ugyanezt az eredményt hozták. A magasabb dózisu kezelés hatásosabb volt, mint az alacsonyabb, és a Ze 440 kivonat hatásosabb, mint a BNO 1095.

A galagonya (*Crataegus* sp.) és kámfor fix kombinációja évtizedek óta használatban van gyógyszerként a hipotenzió kezelésében Európa több országában, ugyanakkor a klinikai vizsgálatok eredményeit még nem elemezték metaanalízisben. Összesen négy randomizált vizsgálat adatait vetettük statisztikai vizsgálat alá, amelyekben a galagonya és kámfor kombinációjának hipotenziós és normotenziós betegek vérnyomására és mentális teljesítményére gyakorolt hatását vizsgálták.<sup>40\*</sup> Az elemzés azt bizonyította, hogy az aktív kezelés hatásosabban emelte a diasztolés és szisztolés vérnyomást, mint a placebo. A kognitív teljesítményre kifejtett hatás kedvező, de a placebónál nem volt szignifikáns jobb.

A jőféle sáfrány (*Crocus sativus*) újabban nemcsak fűszerként elismert, hanem klinikai vizsgálatok rámutattak antidepresszáns hatására is. A metaanalízisbe összesen 10, az elmúlt években közzétett klinikai vizsgálatot vontunk be.<sup>41\*</sup> Az eredmények metaanalízise alapján megállapítható, hogy a sáfrány szignifikánsabban hatásosabban enyhíti az enyhe és mérsékelt depresszió tüneteit a placebohoz viszonyítva. A szintetikus antidepresszáns fluoxetin és citalopram hatásosabbnak bizonyult, mint a sáfrány, azonban a különbség nem volt szignifikáns.

#### 4. A eredmények várható alkalmazása

A kémiai tér bővítését célzó preparatív fitokémiai kutatások eredményeként izolált vegyületek a gyógyszerkutatás számára nyersanyagként vagy ötletadó molekulaként hasznosulhatnak. A vegyületek egy része esetén elvégzett saját kutatások (pl. lipoalkaloidok gyulladáscsökkentő hatása, potenciális antiaritmiás aktivitása, *N*-alkil-amidok hatása az endokannabinoid rendszerre) irányt mutathatnak a további vizsgálatokhoz. Tekintve, hogy a vegyületek között markáns hatású, esetenként kedvezően szelektív hatású anyagok is vannak, ezek kutatása perspektivikus.

A fitoanalitikai vizsgálatok során a feldolgozás (*Rhodiola rosea* markeranyagai, máriatövis réztartalma, tea teanintartalma) és termékbiztonság (édeskömény furokumarintartalma, fekete nadálytő alkaloidjainak penetrációja) szempontjából jelentős adatokat gyűjtöttünk gyógynövényekről. A termékek jobb minőségellenőrzését célzó kutatásaink rámutattak több étrend-kiegészítő csoport jellemző minőségi problémáira, és ez a hatósági ellenőrzési gyakorlatra is hatással lehet.

A növényekkel végzett farmakológiai és toxikológiai vizsgálatok fontos adatokat szolgáltatnak a biztonságos és racionális gyógynövény-alkalmazáshoz. Ugyanezt a célt szolgálják a növényi termékekkel végzett klinikai vizsgálatok metaanalízisei, amelyek a hatásosság legmagasabb szintű elemzésével biztosítanak evidenciákat a bizonyítékokon alapuló orvoslásnak.

## 5. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- 1\* Csupor, D.; Forgo, P.; Wenzig, E. M.; Bauer, R.; Hohmann, J. Bisditerpene, norditerpene, and lipo-alkaloids from *Aconitum toxicum*. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1779-1782.
- 2\* Forgo, P.; Borcsa, B.; Csupor, D.; Fodor, L.; Berkecz, R.; Molnár V., A.; Hohmann, J. Diterpene alkaloids from *Aconitum anthora* and assessment of the hERG-inhibiting ability of aconitum alkaloids. *Planta Med.* **2011**, *77*, 368-373.
- 3\* Borcsa, B.; Fodor, L.; Csupor, D.; Forgo, P.; Molnár, A.; Hohmann, J. Diterpene alkaloids from the roots of *Aconitum moldavicum* and assessment of Na<sub>v</sub>1.2 sodium channel activity of *Aconitum* alkaloids. *Planta Med.* **2014**, *80*, 231-236.
- 4\* Kiss, T.; Orvos, P.; Bánsághi, S.; Forgo, P.; Jedlinszki, N.; Tálosi, L.; Hohmann, J.; Csupor, D. Identification of diterpene alkaloids from *Aconitum napellus* subsp. *firmum* and GIRK channel activities of some *Aconitum* alkaloids. *Fitoterapia* **2013**, *90*, 85-93.
- 5\* Hajdu, Zs.; Haskó, J.; Krizbai, I. A.; Wilhelm, I.; Jedlinszki, N.; Fazakas, C.; Molnár, J.; Forgo, P.; Hohmann, J.; Csupor, D. Evaluation of lignans from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* for their potential antimetastatic effects in the brain. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 2641-2650.
- 6\* Hajdu, Zs.; Nicolussi, S.; Rau, M.; Lorántfy, L.; Forgo, P.; Hohmann, J.; Csupor, D.; Gertsch, J. Identification of endocannabinoid system-modulating *N*-alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1663-1669.
- 7\* Csupor, D.; Vollár, M.; Kúsz, N.; Kövér, E. K.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Szűcs, P.; Marschall, M.; Senobar Tahaei, S. A.; Zupkó, I.; Hohmann, J. Pigments of the Moss *Paraleucobryum longifolium*: Isolation and Structure Elucidation of Prenyl-substituted 8,8'-linked 9,10-Phenanthrenequinone Dimers. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 268-276.
- 8\* Roza, O.; Lai, W.-C.; Zupkó, I.; Hohmann, J.; Jedlinszki, N.; Chang, F.-R.; Csupor, D.; Eloff, J. N. Bioactivity guided isolation of phytoestrogenic compounds from *Cyclopia genistoides* by the pER8:GUS reporter system. *South African J. Bot.* **2017**, *110*, 201-207.
- 9\* Roza, O.; Martins, A.; Hohmann, J.; Lai, W.-C.; Eloff, J.; Chang, F.-R.; Csupor, D. Flavonoids from *Cyclopia genistoides* and their xanthine oxidase inhibitory activity. *Planta Med.* **2016**, *82*, 1274-1278.
- 10\* Mottaghapisheh, J.; Nové, M.; Spengler, G.; Kúsz, N.; Hohmann, J.; Csupor, D. Antiproliferative and cytotoxic activities of furocoumarins of *Ducrosia anethifolia*. *Pharm. Biol.* **2018**, *56*, 658-664.
- 11\* Csupor, D.; Wenzig, E. M.; Zupkó, I.; Wölkart, K.; Hohmann, J.; Bauer, R. Qualitative and quantitative analysis of aconitine-type and lipo-alkaloids of *Aconitum carmichaelii* roots. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 2079-2086.
- 12\* Borcsa, B.; Widowitz, U.; Csupor, D.; Forgo, P.; Bauer, R.; Hohmann, J. Semisynthesis and pharmacological investigation of lipo-alkaloids prepared from aconitine. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 365-368.
- 13\* Kiss, T.; Borcsa, B.; Orvos, P.; Tálosi, L.; Hohmann, J.; Csupor, D. Diterpene Lipo-Alkaloids with Selective Activities on Cardiac K<sup>+</sup> Channels. *Planta Med.* **2017**, *83*, 1321-1328.
- 14\* Csupor, D.; Borcsa, B.; Heydel, B.; Hohmann, J.; Zupkó, I.; Ma, Y.; Widowitz, U.; Bauer, R. Comparison of a specific HPLC determination of toxic aconite alkaloids in processed Radix aconiti with a titration method of total alkaloids. *Pharm. Biol.* **2011**, *49*, 1097-1101.
- 15\* Peschel, W.; Kump, A.; Horváth, A.; Csupor, D. Age and harvest season affect the phenylpropanoid content in cultivated European *Rhodiola rosea* L. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *83*, 787-802.
- 16\* Peschel, W.; Kump, A.; Zomborszki, Z. P.; Pfosser, M.; Kainz, W.; Csupor, D. Phenylpropanoid content in high-altitude cultivated *Rhodiola rosea* L. provenances according to plant part, harvest season and age. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *111*, 446-456.
- 17\* Péter Zomborszki, Z.; Kúsz, N.; Csupor, D.; Peschel, W. Rhodiosin and herbacetin in *Rhodiola rosea* preparations: additional markers for quality control? *Pharm. Biol.* **2019**, *57*,

- 295–305.
- 18\* Csupor, D.; Boros, K.; Hunyadi, A.; Veres, K.; Hohmann, J. Validation of a densitometric method for the determination of theanine in tea extracts using CP atlas software. *JPC - J. Planar Chromat.* **2012**, *25*, 571–574.
  - 19\* Csupor, D.; Boros, K.; Jedlinszki, N.; Hohmann, J. A Validated RP-HPLC-DAD Method for the Determination of L-Theanine in Tea. *Food Anal. Methods* **2014**, *7*, 591-596.
  - 20\* Boros, K.; Jedlinszki, N.; Csupor, D. Theanine and Caffeine content of infusions prepared from commercial tea samples. *Pharmacogn. Mag.* **2016**, *12*, 75-78.
  - 21\* Csupor, D.; Bognár, J.; Karsai, J. An Optimized Method for the Quantification of Isoflavones in Dry Soy Extract Containing Products. *Food Anal. Methods* **2015**, *8*, 2515-2523.
  - 22\* Kerekes, D.; Csorba, A.; Gosztola, B.; Németh-Zámbori, É.; Kiss, T.; Csupor, D. Furocoumarin Content of Fennel—Below the Safety Threshold. *Molecules* **2019**, *24*, 2844.
  - 23\* Jedlinszki, N.; Kálomista, I.; Galbács, G.; Csupor, D. *Silybum marianum* (milk thistle) products in Wilson's disease: a treatment or a threat? *J. Herb. Med.* **2016**, *6*, 157-159.
  - 24\* Csupor, D.; Szekeres, A.; Kecskeméti, A.; Vékes, E.; Veres, K.; Micsinay, Á.; Szendrei, K.; Hohmann, J. Szildenafil és tadalafillal hamisított étrend-kiegészítők a hazai piacon. *Orv. Hetil.* **2010**, *151*, 1783–1789.
  - 25\* Csupor, D.; Boros, K.; Dankó, B.; Veres, K.; Szendrei, K.; Hohmann, J. Rapid identification of sibutramine in dietary supplements using a stepwise approach. *Pharmazie* **2013**, *68*, 15-18.
  - 26\* Csupor, D.; Micsinay, Á.; Máthé, I.; Horváth-Boros, K.; Kiss, T.; Hohmann, J. Planar chromatography in the quality control of adulterated *Citrus paradisi* seed extract-containing products. *JPC - J. Planar Chromatogr.* **2018**, *31*, 23-27.
  - 27\* Csupor, D.; Boros, K.; Hohmann, J. Low Potency Homeopathic Remedies and Allopathic Herbal Medicines: Is There an Overlap? *PLoS One* **2013**, *8*, e74181.
  - 28\* Jedlinszki, N.; Csupor, D. A validated, rapid HPLC-ESI-MS/MS method for the determination of lycopsamine. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 1181-1182.
  - 29\* Jedlinszki, N.; Balázs, B.; Csányi, E.; Csupor, D. Penetration of lycopsamine from a comfrey ointment through human epidermis. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2017**, *83*, 1-4.
  - 30.\* Vollár, M.; Gyovai, A.; Szucs, P.; Zupkó, I.; Marschall, M.; Csupor-Löffler, B.; Bérdi, P.; Vecsernyés, A.; Csorba, A.; Liktó-Busa, E.; Urbán, E.; Csupor, D. Antiproliferative and antimicrobial activities of selected bryophytes. *Molecules* **2018**, *23*, 1520.
  - 31\* Kiss, T.; Borcsa, B.; Orvos, P.; Tálosi, L.; Hohmann, J.; Csupor, D. Diterpene Lipo-Alkaloids with Selective Activities on Cardiac K<sup>+</sup> Channels. *Planta Med.* **2017**, *83*, 1321-1328.
  - 32\* Orvos, P.; Virág, L.; Tálosi, L.; Hajdú, Z.; Csupor, D.; Jedlinszki, N.; Szél, T.; Varró, A.; Hohmann, J. Effects of *Chelidonium majus* extracts and major alkaloids on hERG potassium channels and on dog cardiac action potential – A safety approach. *Fitoterapia* **2015**, *100*, 156-165.
  - 33\* Roza, O.; Lovász, N.; Zupkó, I.; Hohmann, J.; Csupor, D. Sympathomimetic activity of a *Hoodia gordonii* product: A possible mechanism of cardiovascular side effects. *Biomed Res. Int.* **2013**, 171059 .
  - 34\* Sándor, Zs.; Mottaghipisheh, J.; Veres, K.; Hohmann, J.; Bencsik, T.; Horváth, A.; Kelemen, D.; Papp, R.; Barthó, L.; Csupor, D. Evidence supports tradition: The *in vitro* effects of Roman Chamomile on smooth muscles. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 323.
  - 35\* Kiss, T.; Mácsai, L.; Csupor, D.; Datki, Zs. L. *In vivo* screening of diterpene alkaloids using bdelloid rotifer assays. *Acta Biol. Hung.* **2017**, *68*, 443-452.
  - 36\* Csupor, D.; Blazsó, G.; Balogh, A.; Hohmann, J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 193-195.
  - 37\* Csupor, D.; Widowitz, U.; Blazsó, G.; Laczkó-Zöld, E.; Tatsimo, J. S. N.; Balogh, A.; Boros, K.; Dankó, B.; Bauer, R.; Hohmann, J. Anti-inflammatory activities of eleven *Centaurea* species occurring in the Carpathian basin. *Phyther. Res.* **2013**, *27*, 540-544.

- 38\* Kiss, T.; Szabó, A.; Oszlanczi, G.; Lukács, A.; Tímár, Z.; Tiszlavicz, L.; Csupor, D. Repeated-dose toxicity of common ragweed on rats. *PLoS One* **2017**, *12*, e0176818 .
- 39\* Csupor, D.; Lantos, T.; Hegyi, P.; Benkő, R.; Viola, R.; Gyöngyi, Z.; Csécsei, P.; Tóth, B.; Vasas, A.; Márta, K.; Rostás, I.; Szentesi, A.; Matuz, M. Vitex agnus-castus in premenstrual syndrome: A meta-analysis of double-blind randomised controlled trials. *Complement. Ther. Med.* **2019**, *47*, 102190.
- 40\* Csupor, D.; Viczián, R.; Lantos, T.; Kiss, T.; Hegyi, P.; Tenk, J.; Czumbel, L. M.; Thanyaporn, S. Ngoen; Gyöngyi, Z.; Varga, G.; Gerber, G.; Pétervári, E.; Tóth, B. The combination of hawthorn extract and camphor significantly increases blood pressure: A meta-analysis and systematic review. *Phytomedicine* **2019**, *63*, 152984.
- 41\* Tóth, B.; Hegyi, P.; Lantos, T.; Szakács, Z.; Kerémi, B.; Varga, G.; Tenk, J.; Pétervári, E.; Balaskó, M.; Rumbus, Z.; Rakonczay, Z.; Bálint, E. R.; Kiss, T.; Csupor, D. The Efficacy of Saffron in the Treatment of Mild to Moderate Depression: A Meta-analysis. *Planta Med.* **2019**, *85*, 24–31.